研究论文
Research paper | 22 April 2025, 44(4): 240214 菌物学报 Mycosystema ISSN 1672-6472 CN 11-5180/Q

Copyright © 2025 Institute of Microbiology, CAS. All rights reserved. jwxt@im.ac.cn Http://journals-myco.im.ac.cn Tel: +86-10-64807521
Doi: 10.13346/j.mycosystema.240214
CSTR: 32115.14.j.mycosystema.240214

基于基因组重测序开发中华包革耳(金耳菌)菌株的鉴别标记

沈真辉[1,2#]，杨林雷[1,2#]，曹瑶[1,2]，罗祥英[1,2]，杨爱霞[1]，陆青青[1]，子灵山[1]，李荣春[1,2*]

1 云南菌视界生物科技有限公司 云南省级(珍稀食用菌)企业工程技术中心，云南 昆明 650200
2 云南省张劲松专家工作站 云南(昆明)张劲松药用真菌专家工作站，云南 昆明 650200

摘 要：以中华包革耳(俗称金耳菌)单孢菌株 NX-20 基因组为参考基因组，以 4 个不同交配型单孢菌株 D13、D25、D40 和 D47 基因组重测序数据为研究对象，利用生物信息学软件鉴定出大量的 SNP 和 InDel 变异位点并分析其特征。使用 primer5.0 软件设计 SNP/InDel 标记引物，筛选存在多态性差异的 8 对 SNP 和 6 对 InDel 标记引物对我国金耳栽培产业中广泛使用的 14 个中华包革耳菌株进行遗传多样性分析。SNP 标记分析结果显示，J2F1 菌株在 8 对 SNP 引物中均形成 2 种基因型，其他菌株仅有一种基因型。6 对 InDel 标记引物分析结果显示，J2F1 菌株在第 1、2 及第 5 对引物中能扩增出不同于其他菌株的条带，大部分菌株能扩增出一致的条带(如 YL、YR、JB、LL 及 SC 等菌株)，显示出同种异名现象。本研究结果对我国中华包革耳栽培种质资源的遗传多样性有了比较明确的认识，所获得的 SNP 和 InDel 标记可进一步用于中华包革耳遗传分析，为中华包革耳遗传多样性、种质资源鉴定和保护及分子辅助育种等研究助力。

关键词：中华包革耳；单孢；重测序；插入缺失标记；单核苷酸多型性标记

[引用本文]
沈真辉，杨林雷，曹瑶，罗祥英，杨爱霞，陆青青，子灵山，李荣春，2025. 基于基因组重测序开发中华包革耳(金耳菌)菌株的鉴别标记. 菌物学报，44(4): 240214
Shen ZH, Yang LL, Cao Y, Luo XY, Yang AX, Lu QQ, Zi LS, Li RC, 2025. Identification markers for *Naematelia sinensis* strains based on genome resequencing. Mycosystema, 44(4): 240214

资助项目：云南省张劲松专家工作站(202305AF150084)；云南昆明张劲松药用真菌专家工作站(YSZJGZZ-2022043)
This work was supported by the Yunnan Province ZHANG Jingsong Expert Workstation (202305AF150084) and the Yunnan (Kunming) ZHANG Jingsong Medicinal Fungus Expert Workstation (YSZJGZZ-2022043).
*Corresponding author. E-mail: rongchunli@126.com
#Co-first author
ORCID: SHEN Zhenhui (0009-0001-7896-338X); YANG Linlei (0009-0002-8798-3152)
Received: 2024-07-16; Accepted: 2024-12-10

Identification markers for *Naematelia sinensis* strains based on genome resequencing

SHEN Zhenhui[1,2#], YANG Linlei[1,2#], CAO Yao[1,2], LUO Xiangying[1,2], YANG Aixia[1], LU Qingqing[1], ZI Lingshan[1], LI Rongchun[1,2*]

1 Yunnan Provincial (Rare Edible Mushroom) Enterprise Engineering Technology Centre, Yunnan Junshijie Biotechnology Co. Ltd., Kunming 650200, Yunnan, China
2 Yunnan Province ZHANG Jingsong Expert Workstation, Yunnan (Kunming) ZHANG Jingsong Medicinal Fungus Expert Workstation, Kunming 650200, Yunnan, China

Abstract: Using the genome of *Naematelia sinensis* monospore strain NX-20 as the reference, resequencing data from four monospore strains (D13, D25, D40, and D47) with different mating types was analyzed by using bioinformatics software to identify SNP and InDel positions. Primer5.0 software was used to design SNP/InDel marker primers, resulting in 8 pairs of SNP and 6 pairs of InDel markers with polymorphic differences for genetic diversity analysis of 14 widely used *N. sinensis* strains in the cultivation industry. Results of SNP marker analysis revealed that the J2F1 strain exhibited two genotypes in eight pairs of SNP primers, while other strains showed only one genotype. The analysis results of 6 pair InDel markers showed that the J2F1 strain displayed unique band patterns in the 1st, 2nd, and 5th pairs of primers compared to other strains, while most strains (such as YL, YR, JB, LL, and SC) exhibited consistent band patterns, indicating the phenomenon of synonyms. These findings enhance our understanding of the genetic diversity of *N. sinensis* cultivated germplasm resources, and the identified SNP and InDel molecular markers can serve as valuable tools for genetic analysis, germplasm resource identification, protection and molecular-assisted breeding in *N. sinensis* research.

Keywords: *Naematelia sinensis*; monospore; re-sequencing; InDel marker; SNP marker

中华包革耳(金耳菌) *Naematelia sinensis* (Bandoni & M. Zang) Millanes & Wedin隶属于担子菌门 Basidiomycota、银耳纲 Tremellomycetes、银耳目 Tremellales、包革耳科 Naemateliaceae (Liu *et al*. 2015；杨林雷等 2020)。金耳是由中华包革耳寄生毛韧革菌 *Stereum hirsutum* 上形成的担子果，富含蛋白质、多糖胶质、类胡萝卜素、氨基酸、矿质元素以及维生素等多种营养成分(曹瑶等 2021a, 2021b, 2023)，具有抗氧化、降血脂、抗肿瘤、抗病毒、抗炎、化痰止咳和提高机体免疫力等功效(Wu *et al*. 2019；何容等 2019；杨林雷等 2021)，是一种具有滋补养颜的食药用菌。因其多样的生物活性和独特风味，被广泛用于医药、食品、高端护肤及美容化妆品等行业(Yan *et al*. 2022)。野生金耳主要分布于我国云南、西藏、四川、贵州、湖北、江西和福建等地，但野生金耳资源稀少，远远满足不了市场需求(敬一兵 1984；刘正南和郑淑芳 1995)。目前，市场上的金耳主要通过袋料栽培和椴木栽培获得，但在人工栽培过程中，存在出耳不稳定、产量和品质不高等问题(张林 2005；何容等 2019)。随着金耳产业的不断发展壮大，中华包革耳菌株也随之越来越多，市场菌株混乱，菌株出现同物异名，同名异物的现象。为保护金耳产

业不断壮大过程中所选育的优良菌株资源，需要针对金耳产业育种体系中优良菌株的保护及鉴定开发新的分子标记技术。

近年来，随着测序技术的发展及许多物种基因组测序的不断完成，重测序技术也得到了广泛的应用，利用全基因组重测序技术可以在全基因组范围内挖掘简单重复序列(SSR)、单核苷酸多态性(SNP)、插入缺失标记(InDel)、结构变异(SV)和基因拷贝数变异(CNV)等，其中，单核苷酸多态性(SNP)和插入缺失标记(InDel)作为第三代分子标记技术的代表，具有基因组中分布广泛、多态性高、重现性好等优点，被广泛应用于分类鉴定、变异检测、遗传图谱构建、性状定位、群体进化研究及作物遗传育种等领域(汪文强等 2016；陈星和高子厚 2019)。目前，很多食药用菌的全基因组已完成测序，而 SNP 和 InDel 等分子标记也已广泛应用于食用菌的种质鉴定、遗传多样性分析及遗传育种等领域。沈秀芬等(2021)通过对 5 个香菇菌株重测序，以香菇 L808-1 菌株的全基因组序列为参考基因组，获得大量的 InDel 变异位点，并利用 107 个 InDel 标记对来自国内的 44 份香菇菌株进行遗传多样性分析，将香菇种质资源分为 4 个亚群。刘伟等(2019)基于梯棱羊肚菌 *Morchella importuna* 2 个子囊孢子培养物的全基因组测序数据，对全基因组范围内的变异位点进行分析，获得了大量 SNP/InDel 位点，利用筛选的 75 对 InDel 标记对 58 个单孢菌株进行了遗传连锁图谱分析，获得了 12 个连锁群。贾定洪等(2024)基于基因组重测序发掘了大量金针菇 *Flammulina filiformis* 的 InDel 和 SNP 位点，根据 Primer 3.0 软件设计了 26 对特异性和通用性良好的 InDel 标记引物及 63 对特异性好的 SNP 标记引物。夏会楠等(2024)采用全基因组重测序技术对糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus* 白色和黑色菌株测序，获得大量的 InDel 变异位点，从变异位点中设计的 17 对标记引物能够对 12 份材料进行鉴定和遗传多样性分析。

虽然中华包革耳的基因组(Sun *et al*. 2022)和转录组(陈正启等 2021；沈真辉等 2023b)已测序，但关于中华包革耳菌株分子标记的开发研究仅有少量报道，本课题组沈真辉等(2023a)开发了 4 对能鉴定中华包革耳单孢菌株不同交配型的标记引物，实现了中华包革耳单孢菌株交配型的高效筛选，提高了杂交育种的效率。为了研究中华包革耳不同单孢菌株的基因组变异，应用二代测序的方法对 4 个中华包革耳单孢菌株进行了全基因组重测序。本研究将中华包革耳 NX-20 菌株(Sun *et al*. 2022)作为参考基因组，对中华包革耳 4 个不同交配类型单孢菌株重测序数据进行比对，以挖掘全基因组范围内 SNP、InDel 及 SV 存在的变异并分析其特征，开发多态性 SNP 和 InDel 标记，为中华包革耳的遗传多样性、种质资源鉴定和保护及分子标记辅助育种等提供可靠数据和参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及试剂

1.1.1 供试菌种

将公司中华包革耳主栽品种 J2F1 (保藏号：CGMCC No.41096) 和毛韧革菌 JSJ_JEGJ_X18 (CGMCC No.19659)组合栽培出菇后，依据陈明等(2000)的方法收集中华包革耳担孢子，应用单孢分离法获得单孢菌株。利用沈真辉等(2023a)的方法筛选出 4 种不同交配因子的单孢菌株 D13 (交配型为 *A2B1*)、D25 (交配型为 *A1B1*)、D40 (交配型为 *A1B2*)和 D47 (交配型为 *A2B2*)作为基因组重测序材料。J2F1 菌株是通过单孢杂交后，在金耳工厂化菇房内多代选育驯化栽培得到的菌株，其他栽培菌株采集于全国各地有一定栽培规模的地区，目前金耳栽培规模与其他食用菌相比要小得多，菌株数量也比较少，现采集到的金耳栽培菌株基本可代表市场上的中华包革

耳种质资源概况，将这些菌株用于 SNP 和 InDel 分子标记的鉴定(表 1)。

1.1.2 培养基

常规 PDA 培养基：马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂 15–20 g，蒸馏水 1 L，pH 自然。金耳栽培料按照沈真辉等(2023b)的方法进行配料和培养。

1.1.3 主要试剂和仪器

真菌基因组提取试剂盒、*Taq* 酶试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]，PCR 仪(Labnet 公司)。

1.2 中华包革耳单孢菌株基因组 DNA 提取、建库测序及质量控制

采用真菌基因组提取试剂盒提取 4 个中华包革耳单孢菌株的基因组 DNA，利用 NanoDrop2000 分光光度计测定基因组 DNA 的浓度，并用琼脂糖凝胶(1%，质量体积比)电泳检测 DNA 质量，随后将提取的高质量 DNA 送样至生工生物工程(上海)股份有限公司进行全基因组重测序，对测序得到的原始 reads (双端序列)进行质量评估并过滤得到 clean reads，用于后续生物信息学的分析。测序数据被上传到 NCBI 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)，登录号为 PRJNA972875。

1.3 中华包革耳重测序数据的 SNP 和 InDel 标记鉴定和注释

利用 BWA 软件(http://arxiv.org/abs/1303.3997)将 4 种中华包革耳单孢菌株重测序数据比对到高质量的中华包革耳(NX-20)参考基因组(登录号：PRJNA772294)，统计 4 种中华包革耳单孢菌株基因组的测序深度和覆盖度等信息，并利用基因组分析工具包 GATK (genome analysis toolkit)进行 SNP 和 InDel 位点的鉴定(McKenna *et al*. 2010)。利用 SnpEff 软件(Cingolani *et al*. 2012)对 SNP 和 InDel 位点进行注释，同时利用 Delly 软件(Rausch *et al*. 2012)对 4 个中华包革耳菌株进行基因组结构变异(structure variation, SV)检测，并统计各种 SV 类型。

1.4 功能性分子标记位点相关基因的功能注释

根据中华包革耳 NX-20 基因组注释文件，对变异基因进行功能注释，同时用 Goatools 软件和 R 语言编写脚本对变异基因进行 GO 功能富集分析。

1.5 SNP 和 InDel 标记引物设计及扩增分析

根据每 100 bp 含有 2 个以上碱基变异位点

表 1 中华包革耳菌株信息表

Table 1 List of *Naematelia sinensis* strain information

菌株 Strains	菌株类型 Strain type	来源 Origin	菌株 Strains	菌株类型 Strain type	来源 Origin
D25	单孢 Monospore	云南菌视界生物科技有限公司 Yunnan Junshijie Biotechnology Ltd.	NL	栽培种 Cultivar	云南丽江宁蒗地区 Ninglang area of Lijiang, Yunnan
D40	单孢 Monospore	云南菌视界生物科技有限公司 Yunnan Junshijie Biotechnology Ltd.	XD	栽培种 Cultivar	云南昆明寻甸地区 Xundian area of Kunming, Yunnan
D13	单孢 Monospore	云南菌视界生物科技有限公司 Yunnan Junshijie Biotechnology Ltd.	JB	栽培种 Cultivar	云南昆明地区 Kunming area, Yunnan
D47	单孢 Monospore	云南菌视界生物科技有限公司 Yunnan Junshijie Biotechnology Ltd.	LL	栽培种 Cultivar	福建古田地区 Gutian area, Fujian
J2F1	栽培种 Cultivar	云南菌视界生物科技有限公司 Yunnan Junshijie Biotechnology Ltd.	SC	栽培种 Cultivar	四川省 Sichuan Province
YL	栽培种 Cultivar	云南大理云龙地区 Yunlong area of Dali, Yunnan	ZY	栽培种 Cultivar	甘肃张掖地区 Zhangye area, Gansu
YR	栽培种 Cultivar	云南楚雄永仁地区 Yongren area of Chuxiong, Yunnan	BJ	栽培种 Cultivar	山东省 Shandong Province

区域作为开发 SNP 标记；选择插入缺失序列长度≥30 bp 作为 InDel 标记开发位点区域，提取这些 SNP/InDel 区域序列并生成 fasta 文件，按照通用引物设计原则，通过 primer5.0 软件进行引物设计，筛选出多态性好的 SNP/InDel 标记引物用于检测 14 个中华包革耳菌株样品(表 1)。利用真菌基因组提取试剂盒提取包括 4 种不同交配型中华包革耳单孢(单核)在内的 14 个样品菌株的基因组 DNA 作为模板，SNP 和 InDel 的 PCR 扩增反应体系均按照 *Taq* 酶试剂盒要求进行，通过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测观察；SNP 扩增片段需进行切胶纯化、转化及测序；随后分析序列的 SNP 多态性。

2 结果与分析

2.1 中华包革耳单孢菌株重测序数据的质量控制

将中华包革耳 J2F1 菌株培养至 45 d 后成熟，形成金黄色的金耳子实体(图1A)，此时金耳子实体开始产孢，将分离得到的 4 个不同交配类型的中华包革耳单孢培养 5 d 后形成酵母状的乳白色芽孢(图 1B)，随后取样重测序。经过质控，获得中华包革耳 4 个单孢菌株的重测序数据(clean data)分别为 4.80、3.65、3.49 和 3.57 Gb，平均值为 3.88 Gb，平均读数长度为 150 bp，序列质量 Q30 在 93.43%–93.95%之间，平均 GC 含量为 53.86%，比对率分别为 93.97%、89.23%、92.76%和 88.02%，平均测序深度约为 189X，覆盖度较高(表 2)。这些数据表明，4 个中华包革耳单孢菌株的重测序数据质量较好，可用于后续分析。

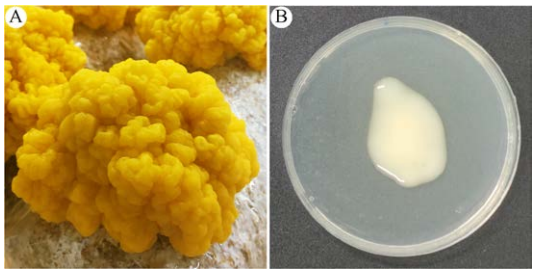


图 1 金耳子实体和单孢形态特征 A：成熟的金耳子实体；B：中华包革耳单孢菌株培养 5d 的形态

Fig. 1 Morphological characteristics of fruiting bodies and monospore strain of *Naematelia sinensis*. A: Mature *Naematelia sinensis* fruiting bodies; B: Colony morphology of monospore strain of *Naematelia sinensis* cultured for 5 d.

表 2 基因组重测序数据的质量控制

Table 2 Quality control of genome re-sequencing data

样品 Sample	D13 菌株 D13 strain	D25 菌株 D25 strain	D40 菌株 D40 strain	D47 菌株 D47 strain	平均值 Average value
总读数 Total read count	32 842 206	25 044 902	23 847 880	24 416 598	26 537 897
高质量序列 Clean base count (Gb)	4.80	3.65	3.49	3.57	3.88
平均读数长度 Average read length (bp)	150	150	150	150	150
Q30 Q30 base ratio (%)	93.80	93.93	93.43	93.95	93.78
GC 含量 GC base ratio (%)	54.81	53.31	54.50	52.83	53.86
基因组比对率 Mapping rate (%)	93.97	89.23	92.76	88.02	90.99
测序深度 Sequencing depth	234X	178X	170X	174X	189X

2.2 4 个中华包革耳单孢菌株基因组中 SNP 和 InDel 位点的检测

借助参考基因组，利用 GATK 软件工具包从 4 个不同交配类型的中华包革耳单孢重测序数据中分别检测到 71 323、71 953、68 504 和 74 725 个 SNP 和 InDel 变异位点(表 3)。根据它们所在基因组的变异分布发现，4 个中华包革耳菌株的 SNP (InDel)位点除了在 contig 7、9、13、14 及 15 仅有少数分布外，在其他 contig 中均有不同丰度的分布，其中 SNP 位点最高丰度为 183 个/5 kb，InDel 位点最高丰度为 42 个/5 kb，有趣的是，SNP (InDel)位点在 contig3 的上游分布丰富，而在中下游区域仅有少数位点的存在(图 2)。

根据 4 个菌株 SNP 突变频谱的分析，发现 SNP 突变类型主要是转换，其中 A->G=T->C 和 C->T=G->A 的转换类型数量接近；在 4 种巅换类型中，G->C=C->G 和 G->T=C->A 的巅换类型占主要数量(图 3A)；转换类型占比 60%左右，巅换类型占比 40%左右(图 3B)；4 个菌株的 Ts/Tv 比值在 1.47–1.49 之间。

2.3 SNP 和 InDel 的注释及富集分析

利用 SnpEff 软件对 SNP 和 InDel 位点在 4 个中华包革耳菌株基因组上的分布进行了注释，结果发现 SNP 和 InDel 位点主要分布于非翻译区的内含子区域和基因间区。其中，28.21%–29.38% (45.19%–47.14%)的 SNP (InDel)位点分布在内含子区域，28.61%–29.63% (43.23%–45.19%)的 SNP (InDel)位点分布在基因间区，此

表 3 中华包革耳不同单孢菌株基因组 SNP 和 InDel 位点的检测

Table 3 The detected SNP and InDel loci from four monospore strains of *Naematelia sinensis* compared to reference genome

变异 Variant	D13 菌株 D13 strain	D25 菌株 D25 strain	D40 菌株 D40 strain	D47 菌株 D47 strain
单核苷酸多态性 SNPs	61 766	62 922	58 073	64 618
插入缺失 InDel	9 557	9 031	10 431	10 107
合计 Total	71 323	71 953	68 504	74 725

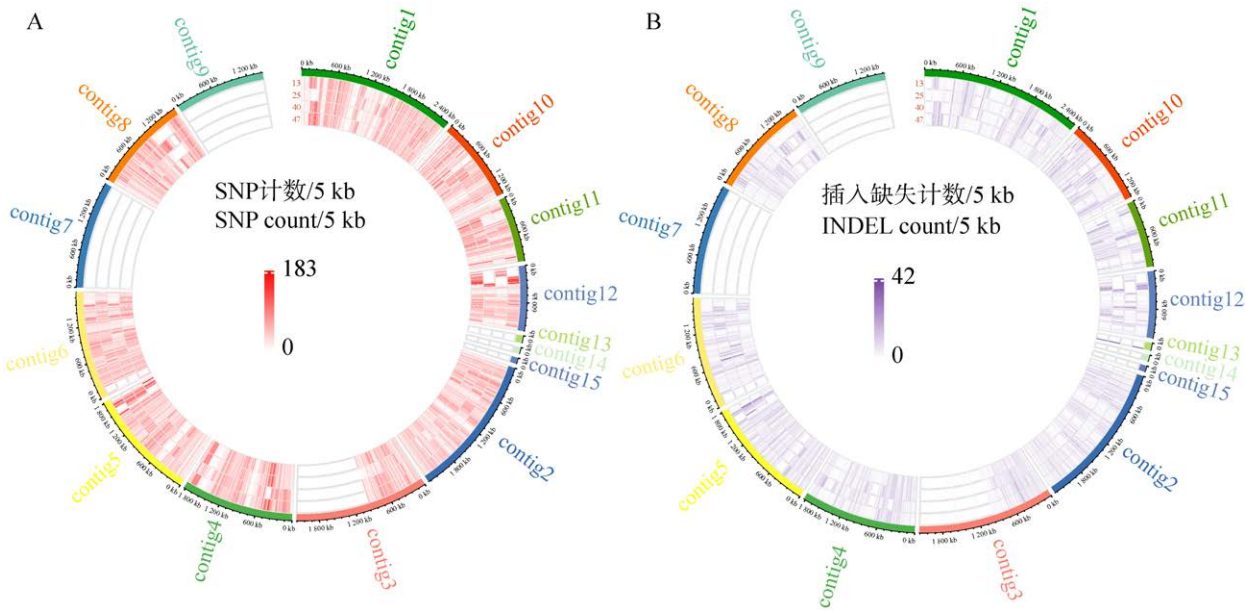


图 2 4 个中华包革耳单孢菌株的 SNP (A)和 InDel (B)位点在参考基因组的分布情况

Fig. 2 Distribution of SNP (A) and InDel (B) sites of four monospore strains of *Naematelia sinensis* in the reference genome.

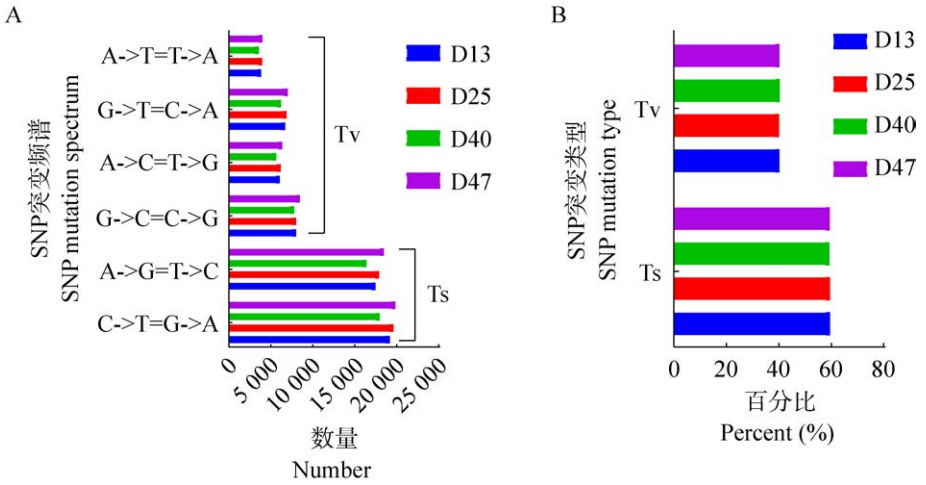


图 3　4 个中华包革耳单孢菌株 SNP 突变频谱(A)及比例(B)　Tv 表示颠换；Ts 表示转换

Fig. 3　SNP mutation spectrum (A) and proportion (B) of four monospore strains of *Naematelia sinensis*. Tv indicates transversion; Ts indicates transform.

外，还有 23.39%–24.82% (13.40%–14.17%)的 SNP 位点属于同义突变(非同义突变)，有 3.85%–3.98% (2.74%–2.97%)的 SNP (InDel)属于剪接体区域突变(图 4A，4B)；在 InDel 位点中还有 3.49%–3.95%的比例属于移码突变(图 4B)；仅有不到 0.5%的 SNP 位点和不到 5%的 InDel 位点属于其他突变(图 4B，4C)。对 13、25、40 及 47 号的 4 个中华包革耳菌株基因组结构变异(SV)进行统计分析和注释，分别含有 362、318、396 及 348 个 SV 变异位点，主要有缺失、插入、倒置及串联重复等类型，数量分别为 185–224，66–80，1–7 及 1–3 个(图 4C)；根据注释信息发现 SV 主要分布于基因间区(60–95 个)和内含子区域(82–95)，少量属于其他变异区域(图 4D)。

分布在基因编码区域的 SNP (InDel)位点中，部分位点会导致基因编码蛋白中氨基酸发生错义突变、缺失、插入及移码突变等，可能会分别影响 D13、D25、D40 及 D47 中华包革耳单孢菌株中 8 858 (647)、9 385 (589)、8 209 (683)及 9 368 (662)个基因的生物学功能(图 5A，5B)。比如，检测到同时存在于 4 种不同交配型的中华包革耳菌株的 1 436 个因 SNP 位点导致的突变基因，通过 GO 数据库注释发现，这些突变基因主要富集在肽结合、核苷酸结合、有机羟基化合物及蛋白质代谢的负调节等过程(图 5C)；而 92 个共同存在的 InDel 位点主要富集在减数分裂细胞周期、调节孢子的形成及磷脂转运等相关功能(图 5D)。

2.4　中华包革耳 SNP 和 InDel 分子标记的开发

2.4.1　中华包革耳 SNP 分子标记的开发和应用

根据前期试验，从 30 对 SNP 引物中筛选出 8 对特异性好、条带清晰的 SNP 标记引物作为后续鉴定分析(表 4)。以 14 株中华包革耳菌株的基因组 DNA 作为模板，进行 PCR 扩增与测序，结果显示，在 8 对 SNP 引物的扩增产物的测序中，J2F1 菌株的正反测序峰图均双峰或套峰，而其子代 4 个不同交配型的单孢菌株及其他菌株均为单峰。以第 5 对引物扩增测序结果为例，J2F1 存在双峰或套峰，其子代单孢菌株为单峰，并且存在 SNP (蓝色虚线框)和 InDel (红色虚线框)位点，形成 2 种基因型(图 6A)。对 J2F1 扩增产物进行单克隆转化后测序分析，8 对引物中的 PCR 产物均测序出 2 种不同基因型序列(如 J2F1-1 和 J2F1-2，图 6B)。对其他菌株进行序列比对发现，13 个菌株可以形成 2 种基因型(图 6B)。

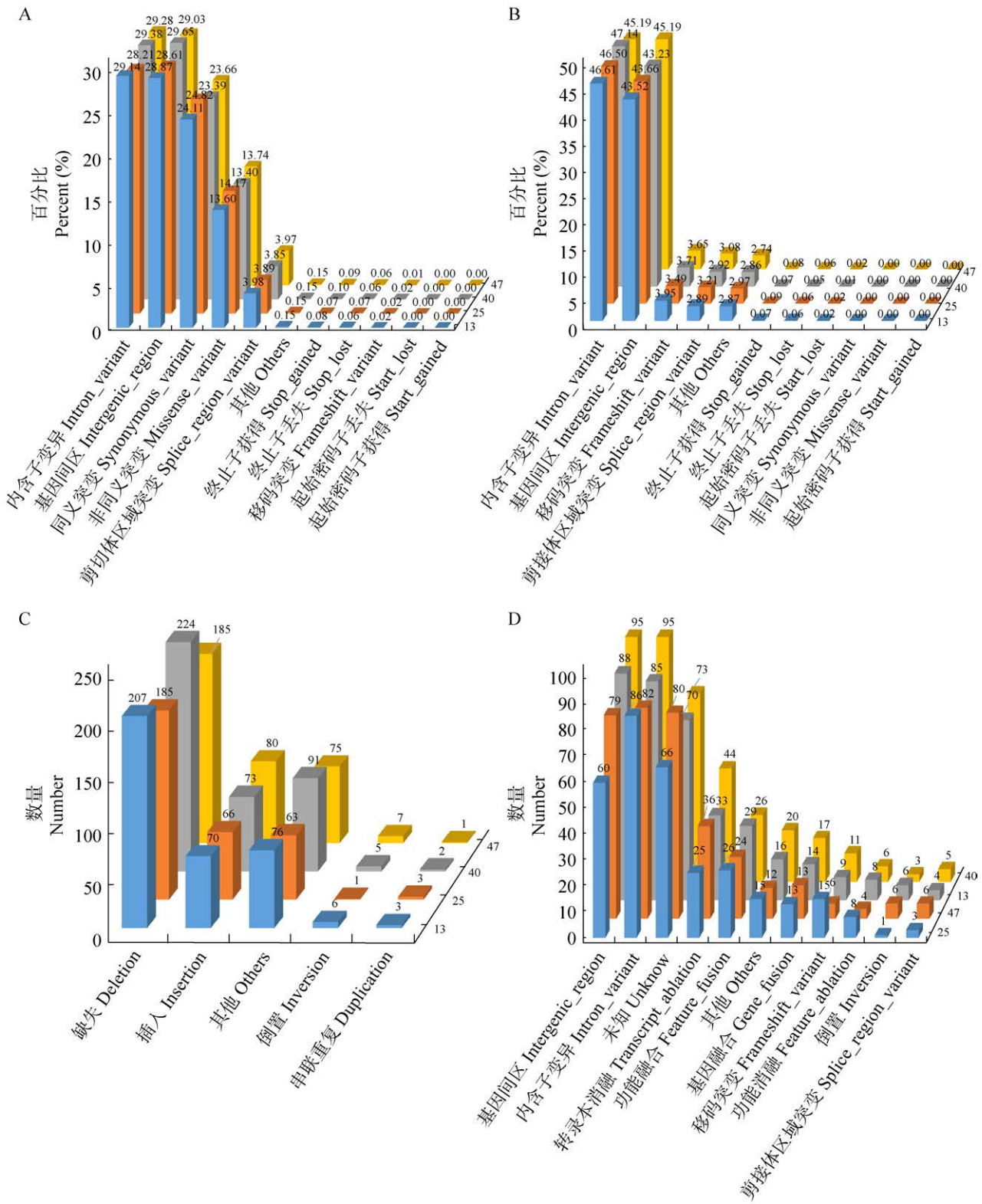


图 4 SNP、InDel 和 SV 分布及统计分析 A：SNP 注释信息；B：InDel 注释信息；C：SV 类型；D：SV 注释信息

Fig. 4 SNP, InDel and SV distribution and statistical analysis. A: SNP annotation information; B: InDel annotation information; C: Type of structural variation; D: Structural variation annotation information.

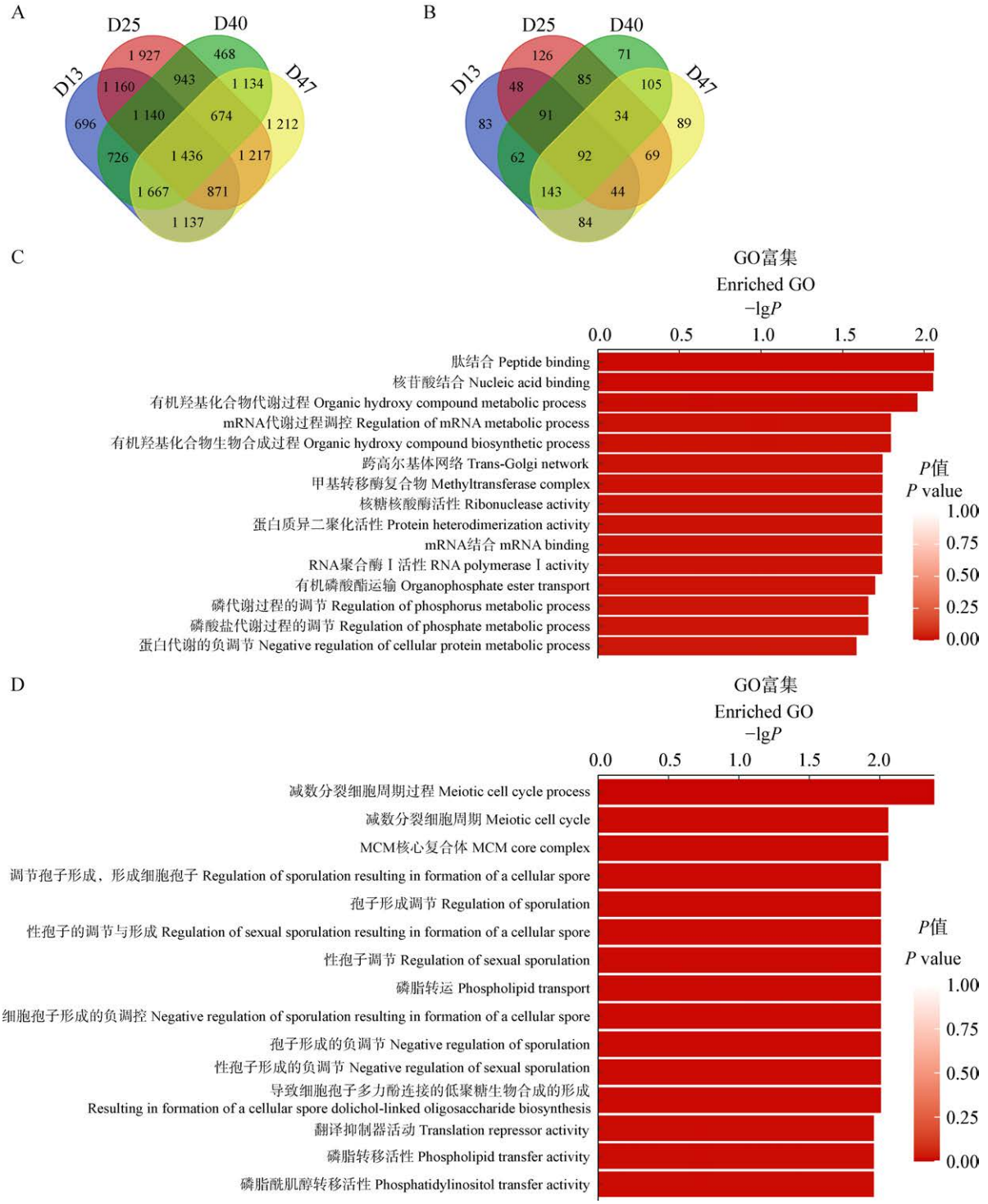


图 5　4 个中华包革耳单孢菌株 SNP 和 InDel 位点的关联基因及 GO 富集分析　A：SNP 位点关联基因的韦恩图；B：InDel 位点关联基因的韦恩图；C：4 个菌株共有的 SNP 位点 GO 富集分析；D：4 个菌株共有的 InDel 位点 GO 富集分析

Fig. 5　Associated genes and GO enrichment analysis of SNP and InDel sites in four monospore strains of *Naematelia sinensis*. A: Venn diagram of SNP loci-associated genes; B: Venn diagram of InDel loci-associated genes; C: GO enrichment analysis of shared SNP loci among four strains; D: GO enrichment analysis of shared InDel loci among four strains.

表 4　8 对 SNP 标记引物信息

Table 4　Primer information for 8 pairs of SNP markers

引物名称 Primer name	染色体位置 Chromosome location	基因组位置 Genomic location	正向引物 Forward primer (5′→3′)	反向引物 Reverse primer (5′→3′)	退火温度 Annealing temperature (℃)
NaSNP-1	Contig1	2 383 925–2 384 673	TGAACTGTTGGGAGAGGAG	GGTCTGGTAATGGAGGTGAG	55
NaSNP-2	Contig10	808 944–809 950	GCACAGACTGGATGCTCAAA	CGATTCCTTCGGTTCATTC	55
NaSNP-3	Contig11	130 189–131 525	ATCCCACGCATACTCACTG	GTGCTGGACAAACGCATT	56
NaSNP-4	Contig11	132 154–133 497	AACCTTGTCTCGTTTCCCT	ATCCGCTGTTCCGTTGTA	56
NaSNP-5	Contig4	135 679–137 226	TGTCTCTACCTCTACCTCTGCG	TTGGCGTGTCAGTGGAAA	54
NaSNP-6	Contig5	137 016–138 543	ACAAGAGGTGAGTAGATGGGA	CGAGCAAGCCAAGATGAT	55
NaSNP-7	Contig6	150 802–152 050	GTCTTTACAGTCGCACAGTTCT	AACCTCAATGTTACCAACGG	54
NaSNP-8	Contig12	13 000–14 250	TGTCAGGAACTTATCCGACC	CCCGTCTTCTTTGCCTTCT	54

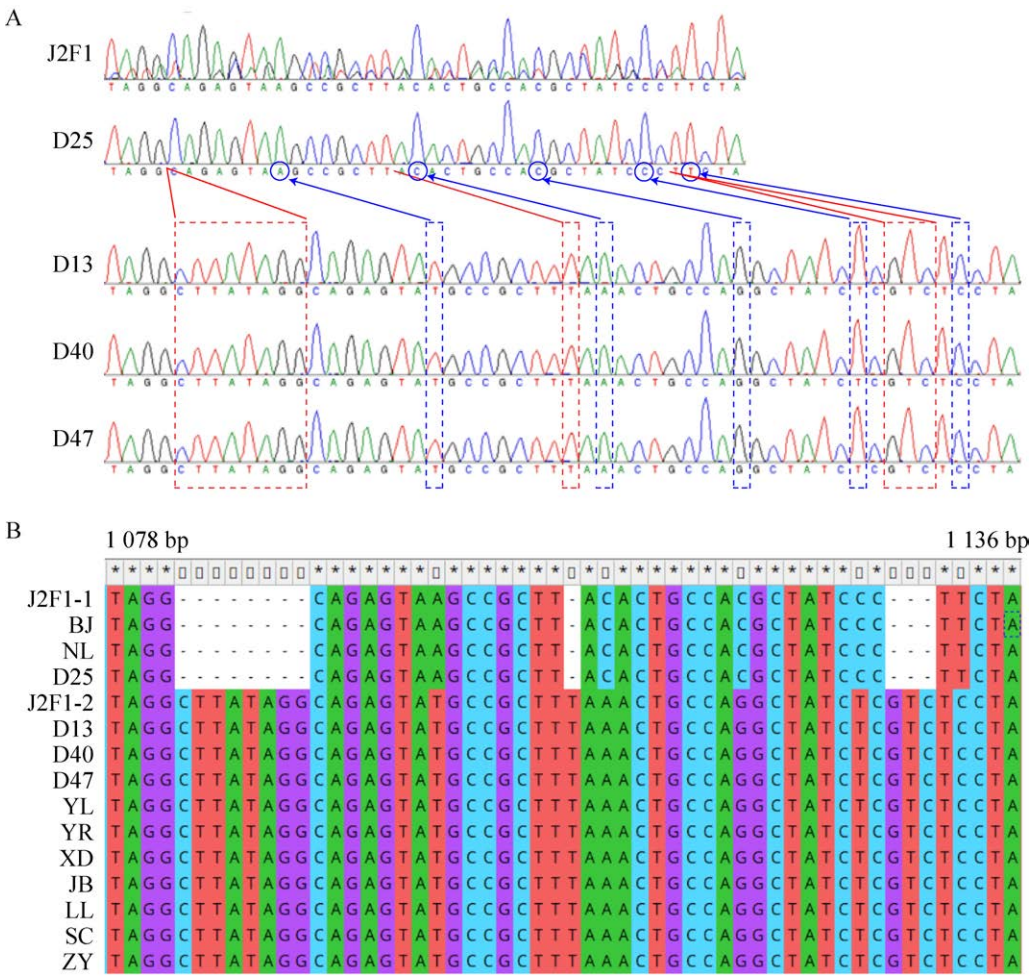


图 6　NaSNP-5 引物扩增片段部分测序峰图(A)和部分序列(B)　红色虚线方框表示插入缺失位点；蓝色虚线方框表示 SNP 变异位点；J2F1-1 和 J2F1-2 分别表示 J2F1 菌株不同基因型的单克隆子

Fig. 6　Partial sequencing peak maps (A) and partial sequences (B) of the amplified fragments of NaSNP-5 primers. Red dashed boxes indicate InDel sites; Blue dashed boxes indicate SNP variant sites; J2F1-1 and J2F1-2 indicate monoclonals of different genotypes of the J2F1 strain respectively.

在 8 对 SNP 分子标记引物中，扩增片段在 583–1 344 bp 之间，SNP 变异数量在 17–77 个之间，平均每 100 bp 大于 2 个 SNP 位点。除 NaSNP-3 和 NaSNP-7 外，其他 6 对引物均能扩增出不同类型的 InDel 位点，其中 NaSNP-5 的 InDel 类型最多，有 5 种类型(表 5)。13 个菌株中，ZY 和 BJ 的基因型除了在 NaSNP-5 引物中不同外，在其他引物中均属于同一基因型，表明其亲缘关系较近。D25 和 D47 在 SNP 引物 3、4、6、7 均属于同一基因型，而大部分菌株在不同 SNP 引物扩增序列中属于同一基因型(表 5)。

2.4.2 中华包革耳 InDel 标记引物的开发和应用

根据前期试验，从 20 对 InDel 标记引物中筛选 6 对多态性良好的 InDel 引物作为后续鉴定分析(表 6)，其中 6 对 InDel 引物位于不同的 contig 中，退火温度在 54–56 ℃。

利用 6 对 InDel 标记引物对 14 个中华包革耳供试菌株进行扩增分析，结果表明 6 对引物均能扩增出清晰的条带，在第 1 对引物中扩增出了 4 种类型的条带，其中 D25、D40、ZY 及 BJ 菌株在约 270 bp 处扩增出共同条带，NL 菌株在约 270/480 bp 处扩增出 2 个条带，而 J2F1 菌株在约 270/480/1 000 bp 处扩增出 3 个条带，其他菌株在约 480 bp 处扩增出共同条带(图 7A)。在第 2 对引物中，J2F1 菌株能扩增出 2 个条带，能区别于其他菌株(图 7B)；在第 3 对引物中，J2F2 和 NL 菌株均能扩增出 2 个共同条带，D25、D47、ZY 及 BJ 菌株在约 410 bp 处均能扩增出共同条带，其他菌株在约 280 bp 处均能扩增出共同条带(图 7C)；同样，在第 4 对引物中，J2F1 和 NL 菌株在约 190/475 bp 处能扩增出 2 个条带，D13、D47、ZY 及 BJ 菌株在约 190 bp 处均能扩增出共同条带，而其他菌株在约 475 bp 处能扩增出 1 个条带(图 7D)；在第 5 对引物中，J2F1 菌株在约 230/650 bp 处扩增出了 2 个条带，而其他菌株仅有 1 个条带，表明 J2F1 菌株能鉴别于其他菌株(图 7E)；而在第 6 对引物中，YL 和 YR 菌株未能扩增出条带，其他菌株在约 580 bp 处均

表 5 14 个供试菌株扩增序列的 SNP 变异数量统计及基因型分析

Table 5 SNP variant counts and genotype analysis of the amplified sequences of the 14 test strains

引物名称 Primer name	扩增片段 Amplified fragment (bp)	SNP 变异数量 Number of SNP variations	InDel 类型 InDel type	基因型Ⅰ Genotype Ⅰ	基因型Ⅱ Genotype Ⅱ
NaSNP-1	590/583	28	CAGTGTT/	D25, D47, NL, YL, YR, XD, JB, LL, SC	D40, D13, ZY, BJ
NaSNP-2	785/782	17	G/, GT/	D25, D47, NL, YL, YR, XD, JB, LL, SC	D13, D40, ZY, BJ
NaSNP-3	957	27	–	D13, D40, NL, YL, YR, XD, JB, LL, SC	D25, D47, ZY, BJ
NaSNP-4	1 100/1 096	28	T/, T/, G/, C/	D13, D40, NL, YL, YR, XD, JB, LL, SC	D25, D47, ZY, BJ
NaSNP-5	1 344/1 308	18	CACCCCCGCCGCGCGTCTCGA/, TCG/, CTTATAGG/, T/, GTC/	D13, D40, D47, ZY, YL, YR, XD, JB, LL, SC	D25, BJ, NL
NaSNP-6	1 276/1 275	64	C/	D13, D40, NL, YL, YR, XD, JB, LL, SC	D25, D47, ZY, BJ
NaSNP-7	1 012	77	–	D13, D40, NL, YL, YR, XD, JB, LL, SC	D25, D47, ZY, BJ
NaSNP-8	1 060/1 059	27	T/	D25, D47, NL, YL, YR, XD, JB, LL, SC	D13, D40, ZY, BJ

注：–表示无

Note: – indicates none.

表 6　6 对 InDel 标记引物信息

Table 6　Primer information for 6 pairs of InDel markers

引物名称 Primer name	染色体位置 Chromosome location	基因组位置 Genomic location	正向引物 Forward primer (5′→3′)	反向引物 Reverse primer (5′→3′)	退火温度 Annealing temperature (℃)
NaInDel-1	Contig12	293 220–293 800	AGAGTGATGGCAAGTCTGG	GTGTTGAGCCGTATGTATGC	54
NaInDel-2	Contig1	1 948 000–1 948 600	CGGACCTTGACCATTTGA	CTCGTTCCACTCCATCAAC	54
NaInDel-3	Contig8	563 300–563 800	ATGACGCCGTAACGACTAC	CGGATGTGAGAGTTGGACA	56
NaInDel-4	Contig10	735 700–736 400	ACCCAAGGCGTGTAGGTAT	CATAGCAACAGCGAGGACA	56
NaInDel-5	Contig1	2 154 647–2 155 249	ACCTGGAGGCAATGTTCAG	ATTCTCAACGGTCAGTGGC	54
NaInDel-6	Contig12	293 220–293 800	AGAGTGATGGCAAGTCTGG	GTGTTGAGCCGTATGTATGC	56

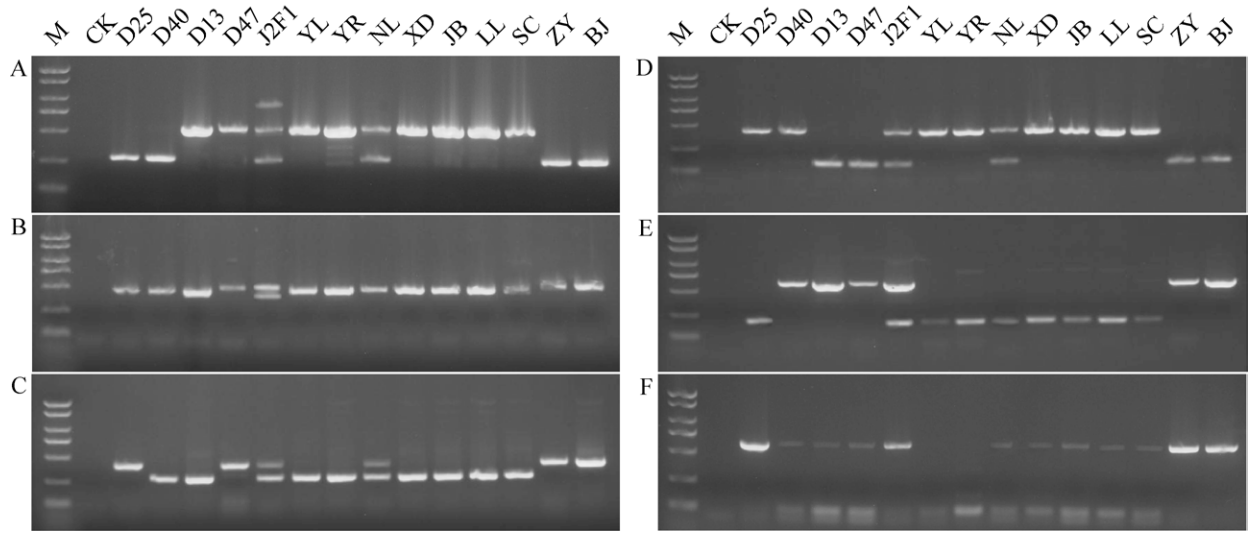


图 7　中华包革耳 InDel 引物的多态性扩增　M 代表 marker，条带从上往下依次为 2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp；CK 为无模板清水对照；A–F 分别为 NaInDel1–NaInDel6 引物扩增图谱

Fig. 7　Polymorphism amplification of InDel primers in the mapping population of *Naematelia sinensis*. M indicates standard DNA marker, and the bands from top to bottom are 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp and 100 bp respectively. CK indicates non-template control; Figures A–F represent the amplification map of NaInDel1–NaInDel6 primers, respectively.

能扩增出共同条带(图 7F)。综上所述，J2F1 菌株在第 1、2 及第 5 对 InDel 引物中，均能区别于其他菌株，可用作菌株的分子标记引物。

3　讨论

早期关于中华包革耳分子标记的开发少有报道，仅有沈真辉等(2023a)对中华包革耳菌株进行了分子标记的开发，而相比于香菇、金针菇、糙皮侧耳及羊肚菌等食用菌分子标记的开发与研究，依然较为滞后。近年来，随着测序技术的发展，新一代高通量测序更为低廉、高效，为大规模地开发 DNA 分子标记提供了新的有效方

法，广泛运用于遗传连锁图谱构建、DNA 指纹图谱构建以及分子标记辅助选择育种等领域(汪文强等 2016；陈星和高子厚 2019)。本研究利用基因组重测序技术，对中华包革耳 4 个不同交配型单孢菌株的 SSR、SNP 及 InDel 标记进行挖掘及特征分析，为后期金耳菌分子标记的开发与应用提供数据支持。

本研究从 4 个中华包革耳不同交配型单孢菌株的重测序数据鉴定到大量的 SNP (InDel)位点，根据它们所在基因组的变异分布发现，4 个中华包革耳单孢菌株的 SNP (InDel)位点除了在 contig7、9、13、14 及 15 仅有少数分布外，在其他 contig 中均有不同丰度的分布；根据注释及富集分析发现，SNP (InDel)变异位点主要位于内含子区域和基因间区；SV 结构变异分析发现，含有缺失、插入、倒置及串联重复等类型，主要注释在基因间区和内含子区域。4 个中华包革耳单孢菌株的 SNP 变异有 13.40%–14.13%的比例属于错义突变，GO 数据库富集分析发现，共同存在突变基因主要富集在肽结合、核苷酸结合、有机羟基化合物及蛋白质代谢的负调节等过程。InDel 突变位点有 3.49%–3.95%比例属于移码突变，这些变异基因主要富集在减数分裂细胞周期、调节孢子的形成及磷脂转运等相关功能。以上结果表明中华包革耳单孢在减数分裂过程中可能发生了染色体重组和同源染色体交换等现象，促进了物种的遗传多样性，这与羊肚菌(刘伟等 2019)和刺芹侧耳(魏传正等 2023)的研究结果相类似。

在 8 对 SNP 标记引物扩增片段的分析中，J2F1 菌株测序结果均存在杂合双峰或套峰，这可能是由于双核菌株的 2 个细胞核基因组不同造成，其子代在减数分裂过程中，经交换重组，理论上又产生不同重组型配子，为新品种选育提供丰富的遗传基础，这与王大莉(2012)对香菇栽培品种的 SNP 标记研究结果相一致，但在其他栽培菌株中的测序结果均为单峰，这可能是由于 2 个核的基因组在该扩增区域位点的 DNA 序列是保守一致的，这也是 J2F1 菌株与其他菌株的来源可能存在遗传多样性的原因。在其余 13 个菌株序列比较分析中，可形成 2 种基因型，其中 ZY 和 BJ 基因型除了 NaSNP-5 不同外，其他引物的基因型一致，说明这 2 个地区的中华包革耳亲缘关系较近；对于其他不同地区的中华包革耳菌株，如 YL、YR 及 SC 等菌株在 8 对 SNP 引物中，均属于相同基因型，表明这些地区的中华包革耳菌株可能属于同一菌株或亲缘关系较近。进一步表明，本研究筛选到的 SNP 标记引物具有可靠性和准确性，可用于后续种质资源的鉴定。在 6 对 InDel 标记引物分析结果中发现，14 个中华包革耳菌株中如 J2F1 和 NL 能鉴别于其他菌株，而 ZY 和 BJ 菌株能鉴别于其他菌株如 YL、YR 及 SC 等，说明所设计的 6 对 InDel 引物具有多态性。以上结果表明，本研究筛选得到的 SNP 和 InDel 标记可作为 J2F1 菌株的分子标记，为今后该品种的知识产权保护提供支持。

本研究基于 4 个不同交配型中华包革耳单孢菌株重测序数据挖掘了海量的 SNP 和 InDel 标记，为中华包革耳的遗传多样性、种质鉴定及种质资源保护等研究提供有效工具，为进一步基因研究和分子标记辅助育种等提供大量分子标记资源。

作者贡献

沈真辉：论文构思、数据分析、论文撰写及修改；杨林雷：文献收集、标记引物开发；曹瑶：收集培养菌株、论文修改；罗祥英：收集栽培样品；杨爱霞：DNA 提取、标记引物扩增；陆青青：样品分离纯化；子灵山：菇房管理；李荣春：论文构思及审阅。

利益冲突

作者声明，该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

Cao Y, Li RC, Yang LL, Li MJ, Luo XY, Shen ZH, Wen SF, 2021a. Amino acid composition and nutritional evaluation of protein of industrial cultivated *Naematelia aurantialba*. Edible and Medicinal Mushrooms, 29(2): 152-156 (in Chinese)

Cao Y, Li RC, Yang LL, Li MJ, Luo XY, Shen ZH, Wen SF, 2021b. Basic nutrition component analysis and quality evaluation of industrial cultivated "Jiner" (*Naematelia aurantialba*). Edible and Medicinal Mushrooms, 29(4): 318-322 (in Chinese)

Cao Y, Yang XJ, Yang LL, Li RC, Li MJ, Luo XY, Shen ZH, Lu QQ, Zhao XW, 2023. Effects of the fresh mushroom of *Naematelia aurantialba* on the noodle quality. Food Engineering, 2023(3): 27-30, 34 (in Chinese)

Chen M, Chen LG, Wang GL, 2000. Preliminary studies on polarity determination of *Tremella fuciformis*. Journal of Huazhong Agricultural University, 19(2): 138-141 (in Chinese)

Chen X, Gao ZH, 2019. The study and application of DNA molecular marker technique. Molecular Plant Breeding, 17(6): 1970-1977 (in Chinese)

Chen ZQ, Yu JF, Feng YL, Ma M, Yue WS, Guo X, 2021. Transcriptome analysis of *Tremella aurantialba* at mycelium and fruiting body stages. Biotechnology Bulletin, 37(6): 73-84 (in Chinese)

Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SS, Lu XY, Ruden DM, 2012. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms. Fly, 6(2): 80-92

He R, Luo XL, Li JY, Zhang WS, 2019. Research status and prospect of *Tremella aurantialba*. Edible and Medicinal Mushrooms, 27(1): 41-47 (in Chinese)

Jia DH, Wang B, He XL, Liu X, 2024. Exploitation of InDel, SV and abundance SNP markers in *Flammulina filiformis* based on genome resequencing. Mycosystema, 43(7): 230228 (in Chinese)

Jing YB, 1984. Geographical distribution of *Tremella aurantialba* in China. Edible Fungi, 1984(5): 12, 43 (in Chinese)

Liu W, Zhang QQ, Shu F, Cai YL, Ma XL, Bian YB, 2019. Genome-wide SNP/InDel analysis and the construction of genetic linkage maps based on Indel markers of *Morchella importuna*. Mycosystema, 38(12): 2195-2204 (in Chinese)

Liu XZ, Wang QM, Göker M, Groenewald M, Kachalkin AV, Lumbsch HT, Millanes AM, Wedin M, Yurkov AM, Boekhout T, Bai FY, 2015. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. Studies in Mycology, 81: 85-147

Liu ZN, Zheng SF, 1995. The economic value and development and utilization status of *Tremella aurantialba*. Edible Fungi of China, 1995(1): 23-24 (in Chinese)

McKenna A, Hanna MG, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly MJ, DePristo MA, 2010. The Genome Analysis Toolkit: a mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Research, 20(9): 1297-1303

Rausch T, Zichner T, Schlattl A, Stütz AM, Benes V, Korbel JO, 2012. DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. Bioinformatics, 28(18): i333-i339

Shen XF, Zhang LJ, Zhang MY, Zhang D, Yu HL, Li Y, 2021. Genetic diversity and population structure of *Lentinula edodes* analyzed by InDel markers. Mycosystema, 40(9): 2266-2281 (in Chinese)

Shen ZH, Li RC, Cao Y, Yang LL, Li MJ, Luo XY, Guo J, 2023a. Primer combinations and identification methods for identifying mating types of *Naematelia aurantialba* monokaryotes: CN116144831B. 2023-07-21 (in Chinese)

Shen ZH, Luo XY, Zhao XW, Li MJ, Cao Y, Yang LL, Lu QQ, Li RC, 2023b. Transcriptome analysis revealed impact of light quality on coloration of *Naematelia aurantialba* fruiting bodies. Acta Edulis Fungi, 30(6): 12-27 (in Chinese)

Sun T, Zhang YX, Jiang H, Yang K, Wang SY, Wang R, Li S, Lei P, Xu H, Qiu YB, Sun DF, 2022. Whole genome sequencing and annotation of *Naematelia aurantialba* (Basidiomycota, edible-medicinal fungi). Journal of Fungi, 8(1): 6

Wang DL, 2012. Construction of a SNP fingerprint databases for *Lentinula edodes* cultivars. MS Thesis, Huazhong Agricultural University, Wuhan. 1-63 (in Chinese)

Wang WQ, Zhao SG, Ma LQ, Guo JJ, Ma YH, Zhao QJ, 2016. The research progress and application of resequencing based on animal genomics. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 47(10): 1947-1953 (in Chinese)

Wei CZ, Wang M, Zhang P, Liu F, Yan JJ, Xie BG, Deng YJ, Xie LY, 2023. Identification of *Pleurotus eryngii* strains by MNP makers based on next-generation sequencing. Acta Edulis Fungi, 30(1): 1-9 (in Chinese)

Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. Fungal Diversity, 98: 1-76

Xia HN, Li DX, Feng F, Sun Y, Wang CX, Zheng SY, 2024. Development of InDel markers in *Pleurotus ostreatus* genome and analysis of genetic diversity of hybrid strains. Edible Fungi, 46(3): 37-41 (in Chinese)

Yan YH, Wang MG, Gan XR, Wang X, Fu CH, Li YM, Chen N, Lü P, Zhang Y, 2022. Isolation, structures, bioactivities, application and future prospective for polysaccharides from *Tremella aurantialba*: a review. Frontiers in Immunology, 13: 1091210

Yang LL, Li RC, Cao Y, Li MJ, Luo XY, Shen ZH, Lu QQ, 2021. Research progress on the pharmacology and health care effects of *Naematelia aurantialba* and its polysaccharides. Edible and Medicinal Mushrooms, 29(3): 176-182 (in Chinese)

Yang LL, Li RC, Cao Y, Li MJ, Luo XY, Yang XJ, Wen SF, Shen ZH, Lu QQ, Zi LS, 2020. Research on the scientific name and taxonomic status of “Jin Er”. Edible and Medicinal Mushrooms, 28(4): 252-255, 276 (in Chinese)

Zhang L, 2005. Cultivation techniques of *Tremella aurantialba*. Practical Rural Technology, 2005(11): 37-38 (in Chinese)

[附中文参考文献]

曹瑶，李荣春，杨林雷，李梦杰，罗祥英，沈真辉，闻绍锋，2021a. 工厂化栽培金耳菌的氨基酸组成及蛋白质营养评价. 食药用菌，29(2): 152-156

曹瑶，李荣春，杨林雷，李梦杰，罗祥英，沈真辉，闻绍锋，2021b. 工厂化栽培金耳菌的营养成分测定及品质评价. 食药用菌，29(4): 318-322

曹瑶，杨晓君，杨林雷，李荣春，李梦杰，罗祥英，沈真辉，陆青青，赵仙伟，2023. 金耳菌浆对挂面品质的影响. 食品工程，2023(3): 27-30, 34

陈明，陈立国，汪国莲，2000. 银耳极性测定的初步研究. 华中农业大学学报，19(2): 138-141

陈星，高子厚，2019. DNA 分子标记技术的研究与应用. 分子植物育种，17(6): 1970-1977

陈正启，余金凤，冯云利，马明，岳万松，郭相，2021. 金耳菌菌丝及子实体的转录组差异分析. 生物技术通报，37(6): 73-84

何容，罗晓莉，李建英，张微思，2019. 金耳菌研究现状与展望. 食药用菌，27(1): 41-47

贾定洪，王波，何晓兰，刘询，2024. 基于基因组重测序发掘金针菇 InDel、SV 及丰度 SNP 标记. 菌物学报，43(7): 230228

敬一兵，1984. 中国金耳菌地理分布测报. 食用菌，1984(5): 12, 43

刘伟，张倩倩，舒芳，蔡英丽，马晓龙，边银丙，2019. 梯棱羊肚菌全基因组 SNP/Indel 分析及基于 Indel 标记的遗传连锁图谱构建. 菌物学报，38(12): 2195-2204

刘正南，郑淑芳，1995. 金耳菌的经济价值和开发利用状况. 中国食用菌，1995(1): 23-24

沈秀芬，章炉军，张美彦，张丹，于海龙，李玉，2021. 利用 InDel 标记分析中国香菇菌株的遗传多样性与群体结构. 菌物学报，40(9): 2266-2281

沈真辉，李荣春，曹瑶，杨林雷，李梦杰，罗祥英，郭晶，2023a. 用于鉴定金耳菌单核体交配型的引物组合及鉴定方法：CN116144831B. 2023-07-21

沈真辉，罗祥英，赵仙伟，李梦杰，曹瑶，杨林雷，陆青青，李荣春，2023b. 利用转录组分析光照对金耳菌子实体转色的影响. 食用菌学报，30(6): 12-27

王大莉，2012. 香菇栽培品种 SNP 指纹图谱库的构建. 华中农业大学硕士论文，武汉. 1-63

汪文强，赵生国，马利青，郭继军，马月辉，赵倩君，2016. 动物基因组学重测序的应用研究进展. 畜牧兽医学报，47(10): 1947-1953

魏传正，王朦，张鹏，刘芳，严俊杰，谢宝贵，邓优锦，谢路昱，2023. 基于二代测序技术的MNP标记鉴别刺芹侧耳菌株. 食用菌学报，30(1): 1-9

夏会楠，李晓东，冯璠，孙悦，王春霞，郑素月，2024. 平菇基因组 InDel 标记开发及杂交菌株遗传多样性分析. 食用菌，46(3): 37-41

杨林雷，李荣春，曹瑶，李梦杰，罗祥英，沈真辉，陆青青，2021. 金耳菌及金耳菌多糖的药用保健功效及其机理研究进展. 食药用菌，29(3): 176-182

杨林雷，李荣春，曹瑶，李梦杰，罗祥英，杨晓君，闻绍峰，沈真辉，陆青青，子灵山，2020. 金耳菌的学名及分类地位考证. 食药用菌，28(4): 252-255, 276

张林，2005. 金耳菌栽培技术. 农村实用技术，2005(11): 37-38